PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :
G01N 27/30, 27/28, 27/49

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/29708

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. December 1994 (22.12.94)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00598

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Mai 1994 (21.05.94)

(30) Prioritätsdaten:
P 43 18 519.3 3. Juni 1993 (03.06.93) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HINTSCHE, Rainer [DE/DE]; Schwedter Strasse 14, D-10199 Berlin (DE). PAESCHKE, Manfred [DE/DE]; An der Wildbahn 59, D-16352 Basdorf (DE). SCHNAKENBERG, Uwe [DE/DE]; Birkenstrasse 10, D-10559 Berlin (DE). WOLLENBERGER, Ulla [DE/DE]; Ossietzkystrasse 9, D-13187 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

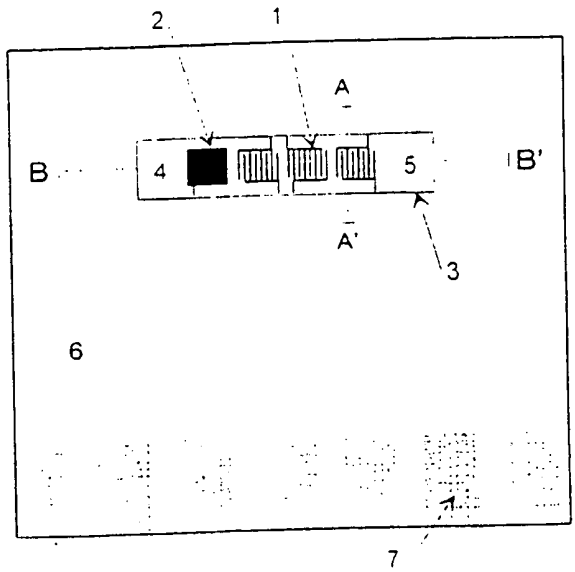
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: ELECTROCHEMICAL SENSOR

(54) Bezeichnung: ELEKTROCHEMISCHER SENSOR

(57) Abstract

The invention relates to an electrochemical sensor with interdigital micro-electrodes (1) with structure widths in the sub-μm range. With a twin or multi-pair array of the interdigital micro-electrodes on a substrate (8), the electrochemical detection of molecules with high sensitivity is made possible and further uses for the detection of chemical reaction cycles are made available. The electrodes may be arranged in a micro-channel applied to the substrate having a constant small volume of a few nanolitres. The electrochemical sensor of the invention is suitable for the multiple measurement of the same species of molecule or as a multi-sensitive sensor in chemical analysis and process control in various fields such as biotechnology, environmental protection or health.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen elektrochemischen Sensor mit interdigitalen Mikroelektroden (1), die Strukturbreiten im sub-μm-Bereich aufweisen. Durch arrayförmige Anordnung zweier oder mehrerer Paare der interdigitalen Mikroelektroden auf einem Substrat (8) werden die elektrochemische Detektion von Molekülen mit hoher Nachweisempfindlichkeit ermöglicht und erweiterte Einsatzmöglichkeiten zur Erfassung chemischer Reaktionsabläufe zur Verfügung gestellt. Die Elektroden können in einem auf das Substrat aufgebrachten Mikrokanal angeordnet sein, der ein konstantes, kleines Volumen von wenigen Nanolitern aufweist. Der erfindungsgemäße elektrochemische Sensor ist zur Vielfachmessung der gleichen Molekülspezies oder auch als multisensitiver Sensor in der chemischen Analytik und Prozeßkontrolle auf verschiedenen Gebieten wie Biotechnologie, Umweltschutz oder Gesundheitswesen einsetzbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich
AU	Australien
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentrale Afrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CS	Tschechoslowakei
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabon
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenya
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam

BESCHREIBUNG

ELEKTROCHEMISCHER SENSOR

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft einen elektrochemischen Sensor nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Elektrochemische Sensoren mit interdigitalen (d.h. fingerartig ineinandergreifenden) Mikroelektroden sind für die chemische Analytik und Prozeßkontrolle auf verschiedenen Gebieten wie Biotechnologie, Umweltschutz, Gesundheitswesen einsetzbar. Sie weisen kleine Diffusionslängen für elektrochemisch aktive Moleküle auf, da die Abstände zwischen den einzelnen fingerartigen Elektrodenbereichen im µm- oder sub-µm-Bereich liegen.

Stand der Technik

Bisher bekannt sind elektrochemische Sensoren mit miniaturisierten planaren Elektroden mit Geometrien oberhalb von 2 µm. Sie werden in Dünnfilmtechnologie hergestellt und als Transduktoren zur Detektion von chemischen oder biochemischen Substanzen verwendet.
Mit Elektrodengeometrien zwischen 20 und 100 µm werden nur Detektionseigenschaften der Elektroden erreicht, wie man sie auch bei konventionellen Elektroden aus dünnen Drähten findet (vgl. M. Suda et al., Proceedings Second World Congress on Biosensors, Genf, Schweiz 1992, p. 400; N.F. Sheppard, Jr. et al., Anal. Chem. 1993, 65, 1199 - 1202.
Aus L.D. Watson (Biosensors 3, 1987/88, 101-115) sind Anordnungen mit zwei parallelen und 5 µm breiten Metalldünnfilmbändern zur Leitfähigkeitsmessung bekannt.

Für die Beschreibung von Spannungsprofilen nutzten T. Matsue et al. (Anal. Chem. 62, 1990, 407-409) eine Anordnung von 16 Elektroden mit 1 mm Länge und 0,1 mm Breite.
Eine Anordnung von sphärischen Elektroden mit Mikrometerabmessungen in der Isolierung auf einer Metallfläche wird von B. Ross et al. (Sensors & Actuators B7, 1992, 758-762) beschrieben. Durch die elektrisch parallel miteinander verbundenen Mikroelektroden entsteht dabei nur ein Meßsignal bei voltammetrischen und chronoamperometrischen Messungen.
I. Fritsch-Faules et al. (Anal. Chem. 64, 1992, 1118-1127) verwenden eine Anordnung mit 4 µm breiten und 8 µm voneinander entfernten Elektroden für die Bestimmung von Konzentrationsprofilen von Redoxzentren in Polymerfilmen.
Ein elektrochemischer Sensor mit einem Paar interdigitaler Mikroelektroden ist aus O. Niwa et al. (Anal. Chem. 62, 1990, 447-452) bekannt. An den Mikroelektroden dieses Sensors mit Strukturbreiten zwischen 0,75 und 10 µm wurden erstmals Verstärkungseffekte durch elektrochemisches Rezyklisieren von reversiblen Redoxmolekülen aufgezeigt.
Alle beschriebenen Elektroden wurden jeweils in stationären Meßverfahren eingesetzt.

Darstellung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen elektrochemischen Sensor anzugeben, der die elektrochemische Detektion von Molekülen mit höherer Nachweisempfindlichkeit ermöglicht und erweiterte Einsatzmöglichkeiten zur Erfassung chemischer Reaktionsabläufe bietet.

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist in Anspruch 1 angegeben. Weiterbildungen und besondere Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Erfindungsgemäß weist der elektrochemische Sensor nach Anspruch 1 zwei oder mehr Paare interdigitaler Mikroelektroden mit Strukturbreiten unter 1 µm auf, die als Mikroelektrodenarray auf einem Substrat angeordnet sind. Die einzelnen Paare sind unabhängig voneinander mit elektrischen Potentialen be-

aufschlagbar, und die Meßeffekte an den einzelnen Elektroden sind unabhängig voneinander ableitbar. Unter Meßeffekten sind hier insbesondere amperometrische, potentiometrische oder impedimetrische Effekte zu verstehen. Vorzugsweise wird ein planares Substrat aus Glas, Saphir, Silizium oder Polymeren verwendet, wobei die Elektroden in Planartechnologie aufgebracht werden. Durch die Feinstrukturierung der Elektroden wird erreicht, daß die Abstände zwischen den interdigitalen, d.h. fingerartig angeordneten Mikroelektroden (z.B. Abstände von ca. 700 nm) klein werden gegenüber den Entfernungen, die nachzuweisende Moleküle während der Meßzeit zurücklegen. Dies ermöglicht es, das gleiche Molekül mehrfach elektrochemisch zu erfassen, z.B. es wiederholt zu oxidieren und zu reduzieren, bevor es aus dem Elektrodenbereich wegdiffundiert ist.
Auf diese Weise erreicht man besonders vorteilhafte Verstärkungseffekte. Die erfindungsgemäße mehrfache Anordnung dieserart feinstrukturierter Elektrodenpaare führt in vorteilhafter Weise zur Multiplikation des eben beschriebenen Verstärkungseffektes, indem mit geeigneter Multielektrodenmeßtechnik (z.B. mit einem rechnergestützten Multipotentiometer) sowohl simultane Messungen als auch die Wiedererfassung von Molekülspezies, die vorher an einem benachbarten interdigitalen Mikroelektrodenpaar erzeugt wurden, realisiert werden. Simultane Messung und Wiedererfassung führen zu einer signifikanten Verbesserung der analytischen Nachweisempfindlichkeit.
Zusätzliche vorteilhafte Einsatzmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Sensors sind weiter unten beschrieben.

Die Mikroelektroden bestehen gemäß Anspruch 2 vorzugsweise aus dünnen Schichten von Edelmetallen und/oder potentialbildenden Metalloxiden (z.B. Silber-Silberhalogenid) oder Metallsalzen. Diese dünnen Schichten sind als Dünnfilmelektroden so in die Substratoberfläche eingelegt bzw. eingegraben, daß eine Planarisierung der Oberfläche und gleichzeitig eine mechanische Stabilisierung der Elektroden erreicht wird. Durch die Planarisierung wird die Diffusionscharakteristik zwischen zwei benachbarten Elektroden optimiert.

Eine besonders vorteilhafte Weiterbildung des erfindungsgemäßen Sensors besteht nach Anspruch 3 darin, daß sich die aktiven Flächen der Mikroelektroden in einem Mikrokanal mit Zu- und Abflußöffnung befinden, der auf das Substrat

aufgebracht ist. Der Mikrokanal kann z.B. ein Kanal oder Graben aus geätztem oder laserstrukturiertem Silizium oder Polymeren sein, der auf das Substrat aufgeklebt oder gebondet ist. Das gesamte Mikroelektrodenarray ist somit in einem definierten und konstanten Raum geringen Volumens, dem erfindungsgemäßen Mikrokanal, angeordnet. Der besondere Vorteil dieser Anordnung ergibt sich aus dem konstanten und kleinen Volumen von wenigen Nanolitern, das die Mikroelektroden umgibt und hochempfindlich kleinste Veränderungen der zu untersuchenden Substanz zu messen gestattet. Bei in Kanalrichtung in Reihe angeordneten interdigitalen Mikroelektrodenpaaren (die fingerartigen Elektrodenbereiche sind senkrecht zur Kanalrichtung angeordnet) ergibt sich die Möglichkeit, gleichzeitig oder zeitversetzt an verschiedenen Stellen des Mikrokanals zu messen.

Als besondere Ausgestaltung ist nach Anspruch 4 der Mikrokanal als mechanisches Hilfsmittel zur Immobilisierung oder Rückhaltung von chemischen oder biochemischen Komponenten ausgebildet, indem z.B. durch schräge oder überstehende Kanalwände Polymerfilme mit immobilisierten Biokomponenten fixiert werden können. Durch siliziumgeätzte Gitter gelingt auch die Retention von chemisch beladenen Mikrokugeln, wobei der Mikrokanal in diesem Fall als Reaktorgefäß dient.

Nach Anspruch 5 sind auf dem Substrat zusätzlich zu den Mikroelektrodenarrays, z.B. als umgebende Fläche, weitere flächige Elektroden als Arbeits- oder Bezugselektroden angeordnet.

Eine Weiterbildung des erfindungsgemäßen elektrochemischen Sensors ist in Anspruch 6 angegeben. Die Weiterbildung betrifft die flüssigkeitsresistente Isolation der Leiterbahnen, die die Mikroelektroden mit Kontaktflächen am Rand des Substrats verbinden, durch eine isolierende Schicht, vorzugsweise aus Siliziumoxid, Siliziumnitrid oder Photolacken. Die isolierende Schicht ist so aufgebracht, daß die aktiven Flächen der Mikroelektroden für das analytische Medium und die Kontaktflächen für elektrische Kontaktierungen zugänglich bleiben.

Der erfindungsgemäße elektrochemische Sensor hat eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten. So läßt er sich z.B. zur simultanen Vielfachmessung der gleichen Molekülspezies einsetzen. Wie in Anspruch 7 dargelegt, können durch Vielfachmessung des gleichen Meßeffektes mit der Mehrfachanordnung der interdigitalen Mikroelektroden die amperometrischen, potentiometrischen oder impedimetrischen Meßeffekte an den einzelnen Mikroelektroden ausgemittelt werden. Jeder Meßeffekt wird entsprechend der Zahl n der Mikroelektroden n-fach gemessen und somit gemäß der Quadratwurzel aus n das Signal-Rauschverhältnis bzw. die Empfindlichkeit der Gesamtmessung verbessert.

Eine weitere Verwendungsmöglichkeit des erfindungsgemäßen Sensors besteht gemäß Anspruch 8 in der gleichzeitigen oder zeitversetzten Detektion unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen oder zur Detektion des zeitlichen Verlaufs der gleichen oder unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen. Durch gleichzeitiges oder zeitversetztes Anlegen unterschiedlicher Potentiale an die einzelnen Mikroelektroden können verschiedene elektrochemische Prozesse, die an den jeweiligen Elektroden ablaufen, gleichzeitig oder zeitversetzt detektiert werden. Zeitversetzte Applikation der Potentiale an räumlich eng benachbarten Mikroelektroden bietet außerdem die vorteilhafte Möglichkeit, schnelle Reaktionen zeitlich verfolgen zu können. Das Meßverfahren der Pulspolarographie kann durch zeitlich alternierendes Anlegen der Potentiale an die Mikroelektroden ebenfalls angewendet werden.

Nach Anspruch 9 läßt sich der erfindungsgemäße Sensor zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit einer analytischen Probe, der zeitlichen Probenveränderung oder von Durchmischungseffekten der Probe verwenden, indem elektrochemisch aktive Moleküle der Probe an verschiedenen Elektroden durch örtlich und/oder zeitlich versetzte Detektion gemessen werden. Ein wesentlicher Vorteil ergibt sich bei der Messung, wenn die Mikroelektroden in einem Mikrokanal gemäß Anspruch 3 mit definiertem und konstantem Volumen angeordnet sind. Vorteilhaft wird dabei an einer Elektrode eine Spezies erzeugt und an einer anderen stömungsabhängig gemessen. Durch das konstante Volumen können bei gestopptem Fluß auch die Probenveränderung mit der Zeit oder Durchmischungseffekte verfolgt werden.

Eine vorteilhafte Verwendung des erfindungsgemäßen Sensors besteht nach Anspruch 10 darin, die Aktivität von Enzymen, die bei Einsatz geeigneter Enzymsubstrate die Freisetzung eines elektrochemisch reversiblen Produktes katalysieren, mit hoher Empfindlichkeit nachzuweisen, indem eine Mikroelektrode eines interdigitalen Mikroelektrodenpaares so polarisiert wird, daß das reduzierte Reaktionsprodukt oxidiert wird, und die andere Mikroelektrode des gleichen interdigitalen Mikroelektrodenpaares so polarisiert wird, daß das oxidierte Reaktionsprodukt reduziert wird. Damit kann die Freisetzung reversibel oxidierbarer und reduzierbarer Produkte, insbesondere hydrolytischer Enzymreaktionen, sehr empfindlich durch die mehrfache Umsetzung des Produktes der Enzymreaktion detektiert werden. Dieser Einsatz des erfindungsgemäßen Sensors erlaubt die Bestimmung von Enzymsubstraten mit hoher Empfindlichkeit und ist für den hochempfindlichen Nachweis von Enzymen geeignet.
Das Enzym kann z.B. auch selbst Analyt sein oder als Marker in Immunotests oder DNA-Hybridisierungsmethoden dienen. Hierbei werden das oder die Enzyme in gelöster Form extern inkubiert oder dem Elektrodenraum (z.B. Mikrokanal) zugeführt oder sind bereits immobilisiert im Mikroreaktionsraum angeordnet.

Die erfindungsgemäße Anordnung wird im folgenden anhand der Ausführungsbeispiele und der Zeichnungen näher erläutert.

Dabei zeigen:

Figur 1 schematisch ein Beispiel des elektrochemischen Sensors,

Figur 2 schematisch einen Querschnitt (A-A´) und einen Längsschnitt (B-B´) durch die Elektrodenanordnung des elektochemischen Sensors aus Fig. 1 mit aufgebrachtem Mikrokanal (in Fig. 1 nicht gezeigt),

Figur 3 Meßkurven der Oxidation von Ferrocyanid, und

Figur 4 Meßkurven des Nachweises von p-Aminophenol.

Ausführungsbeispiel

Ein Ausführungsbeispiel für den erfindungsgemäßen elektrochemischen Sensor ist in Figur 1 gezeigt. Die interdigitalen Mikroelektroden 1 sind hier paarweise in einer Reihe gemeinsam mit der Referenzelektrode 2 auf einem planaren Silizium-Chip 8 angeordnet. Die Leiterbahnen von den Mikroelektroden 1 und der Referenzelektrode 2 zu den elektrischen Kontaktflächen 7 sind durch eine isolierende Schicht 6 abgedeckt.
Ein Querschnitt entlang der Achse A-A´ und ein Längsschnitt entlang der Achse B-B´ aus Figur 1 ist in Figur 2 mit aufgesetztem Mikrokanal 3 gezeigt. Der Mikrokanal 3 besteht in diesem Beispiel aus einem Silizium-Chip 9 mit anisotrop geätztem Graben, der auf den die Mikroelektroden 1 enthaltenden Silizium-Chip 8 aufgeklebt ist. Zwischen den beiden Silizium-Chips 8 und 9 befindet sich die Kleb- bzw. Dichtungsschicht 10. Zu- und Abflußöffnung 4 und 5 des Mikrokanals 3 sind im Längsschnitt zu erkennen.

Figur 3 zeigt mit dem erfindungsgemäßen Sensor aufgenommene Meßkurven der Oxidation von Ferrocyanid. Die einzelnen Maxima ergeben sich nach Zugabe von 62, 124, 250 und 500 µmol/l Ferrocyanid. Dargestellt sind die simultan erfaßten Meßkurven (I(t)) jeder einzelnen von vier Mikroelektroden (el.1,el.2,el.3,el.4), die Meßkurve der Parallelschaltung der vier Elektroden (parallel el.1-4) und die ausgemittelte Meßkurve aus der Simultanmessung mit den vier Elektroden (average el.1-4). Das geringere Signal-Rauschverhältnis bei der mit dem erfindungsgemäßen Sensor möglichen simultanen Vielfachmessung ist deutlich zu erkennen.

Der Verstärkungseffekt der interdigitalen Mikroelektrodenanordnung ist in Figur 4 am Beispiel von Meßkurven (I(t)) des Nachweises von p-Aminophenol mit wiederholter Oxidation/Reduktion an einem interdigitalen Mikroelektrodenpaar (A(Ox) und A´(Red)) dargestellt. Zum Vergleich dazu ist eine Meßkurve (B(Ox)) gezeigt, die bei konventioneller Oxidation (zweite Elektrode ohne Funktion) am gleichen Elektrodenpaar gemessen wurde. (a,b: jeweils Zugabe von 50 µmol/l p-Aminophenol). Die deutlichen Unterschiede in der Signalhöhe zeigen den Vorteil der interdigitalen Mikroelektrodenanordnung.

Im folgenden werden zwei Ausführungsbeispiele zur Verwendung des erfindungsgemäßen elektrochemischen Sensors angegeben.

Das erste Ausführungsbeispiel betrifft die empfindliche Bestimmung der Aktivität von alkalischer Phosphatase. Der in den Figuren 1 und 2 gezeigte elektrochemische Sensor wird in ein Fließsystem eingesetzt. Mit einem Multipotentiostaten wird eine Elektrode eines interdigitalen Elektrodenpaares gegenüber einer Silber/Silberchlorid (gesättigte KCl) - Referenzelektrode (im Abfluß positioniert) auf 250 mV polarisiert. An die jeweils andere Elektrode des Elektrodenpaares wird ein Potential von -50 mV angelegt. In gleicher Weise werden an alle anderen Elektrodenpaare des interdigitalen Mikroelektrodenarrays unabhängig voneinander die entsprechenden anodischen oder kathodischen Potentiale gelegt. Die Meßlösung, bestehend aus 0,1 mol/l Phosphatpufferlösung (pH 7,0) mit 0,1 mol/l KCl, wird mit 0,8 ml/min Fließgeschwindigkeit durch die Elektrodenmikrokammer (Mikrokanal) geführt. Die Grundströme jeder Elektrode werden simultan aber unabhängig voneinander abgeleitet. Nach Injektion von 1 µmol/l p-Aminophenol werden an jeder einzelnen Anode die Erhöhung der Oxidationsströme und an jeder einzelnen Kathode die Veränderung der Reduktionsströme registriert (zum Vergleich siehe Figur 1). Die Meßdaten werden rechnerisch zu rauschverminderten gemittelten Meßsignalen verarbeitet. Durch Registrierung und Verarbeitung der Stromänderung nach Injektion von 2, 5 und 10 µmol/l p-Aminophenol wird eine Eichkurve erstellt. Gleichzeitig werden in externen temperierten Meßgefäßen Proben mit alkalischer Phosphatase mit 5 mmol/l p-Aminophenylphosphat in 1 mol/l Diethanolamin-Puffer (pH 9,8; mit 0,5 mmol/l $MgCl_2$, 37°C) inkubiert. Nach 1 Minute Inkubationszeit werden 100 µl der Reaktionslösung in den fließenden Puffer der Meßanordnung injiziert. Die Veränderung der amperometrischen Elektrodensignale wird wie oben beschrieben einzeln abgeleitet und verarbeitet. Die Enzymaktivität der Meßprobe, definiert als Bildungsgeschwindigkeit von p-Aminophenol aus p-Aminophenylphosphat (1 U = 1 µmol/min), wird mit Hilfe der zuvor erstellten Eichkurve berechnet.

Im zweiten Ausführungsbeispiel wird die Aktivität von alkalischer Phosphatase, die auf einem mikrodispersen Träger immobilisiert ist, mit der im vorhergehenden Ausführungsbeispiel beschriebenen Meßanordnung bestimmt. Die Träger werden dazu in der beschriebenen Mikrokammer durch ein geätztes Siliziumgitter zurückgehalten. Nach der p-Aminophenylphosphat-Zugabe erfolgt die Registrierung der Bildung von p-Aminophenol. Die Messung, Eichung und Auswertung erfolgt analog zum vorhergehenden Ausführungsbeispiel.

PATENTANSPRÜCHE

1. Elektrochemischer Sensor mit interdigitalen Mikroelektroden (1), die Strukturbreiten im sub-µm-Bereich aufweisen,
dadurch gekennzeichnet,
daß auf einem Substrat (8) zwei oder mehr Paare der interdigitalen Mikroelektroden (1) als Mikroelektrodenarray angeordnet sind, wobei die einzelnen Paare unabhängig voneinander mit elektrischen Potentialen beaufschlagbar, und die Meßeffekte an den einzelnen Elektroden unabhängig voneinander ableitbar sind.

2. Elektrochemischer Sensor nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Mikroelektroden aus dünnen Schichten von Edelmetallen und/oder potentialbildenden Metalloxiden oder Metallsalzen bestehen, die so in die Substratoberfläche eingegraben sind, daß sich eine ebene Oberfläche ergibt.

3. Elektrochemischer Sensor nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich die aktiven Flächen der Mikroelektroden in einem Mikrokanal 3 mit Zu- und Abflußöffnung (4, 5) befinden, der auf das Substrat aufgebracht ist.

4. Elektrochemischer Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Mikrokanal so ausgebildet ist, daß er als mechanisches Hilfsmittel für die Immobilisierung von chemisch oder biologisch aktiven Substanzen genutzt werden kann.

5. Elektrochemischer Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß auf dem Substrat zusätzlich weitere flächige Elektroden (2) als Arbeits- oder Bezugselektroden angeordnet sind.

6. Elektrochemischer Sensor nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß Leiterbahnen, die von den Mikroelektroden zu Kontaktflächen führen, durch eine isolierende Schicht, vorzugsweise aus Siliziumoxid oder Siliziumnitrid oder Photolacken, so bedeckt sind, daß nur die aktiven Mikroelektrodenflächen für analytische Medien und die Kontaktflächen für elektrische Kontaktierungen offen zugänglich sind.

7. Verwendung des elektrochemischen Sensors nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Vielfachmessung des gleichen Meßeffektes, wobei die Mehrfachanordnung der interdigitalen Mikroelektroden zur Ausmittelung der amperometrischen, potentiometrischen oder impedimetrischen Meßeffekte an den einzelnen Mikroelektroden genutzt wird.

8. Verwendung des elektrochemischen Sensors nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur gleichzeitigen oder zeitversetzten Detektion unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen oder zur Detektion des zeitlichen Verlaufs der gleichen oder unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen, indem an die einzelnen Mikroelektroden gleichzeitig oder zeitversetzt und/oder zeitlich alternierend unterschiedliche Potentiale angelegt werden.

9. Verwendung des elektrochemischen Sensors nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit einer analytischen Probe, der zeitlichen Probenveränderung oder von Durchmischungseffekten, indem elektrochemisch aktive Moleküle der Probe an verschiedenen Elektroden durch örtlich und/oder zeitlich versetzte Detektion gemessen werden.

10. Verwendung des elektrochemischen Sensors nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zum Nachweis der Aktivität von Enzymen mit hoher Empfindlichkeit, die bei Einsatz geeigneter Enzymsubstrate die Freisetzung eines elektrochemisch reversiblen Produktes katalysieren, indem eine Mikroelektrode eines interdigitalen Mikroelektrodenpaares so polarisiert wird, daß das reduzierte Reaktionsprodukt oxidiert wird, und die andere Mikroelektrode des gleichen interdigitalen Mikroelektrodenpaares so polarisiert wird, daß das oxidierte Reaktionsprodukt reduziert wird.

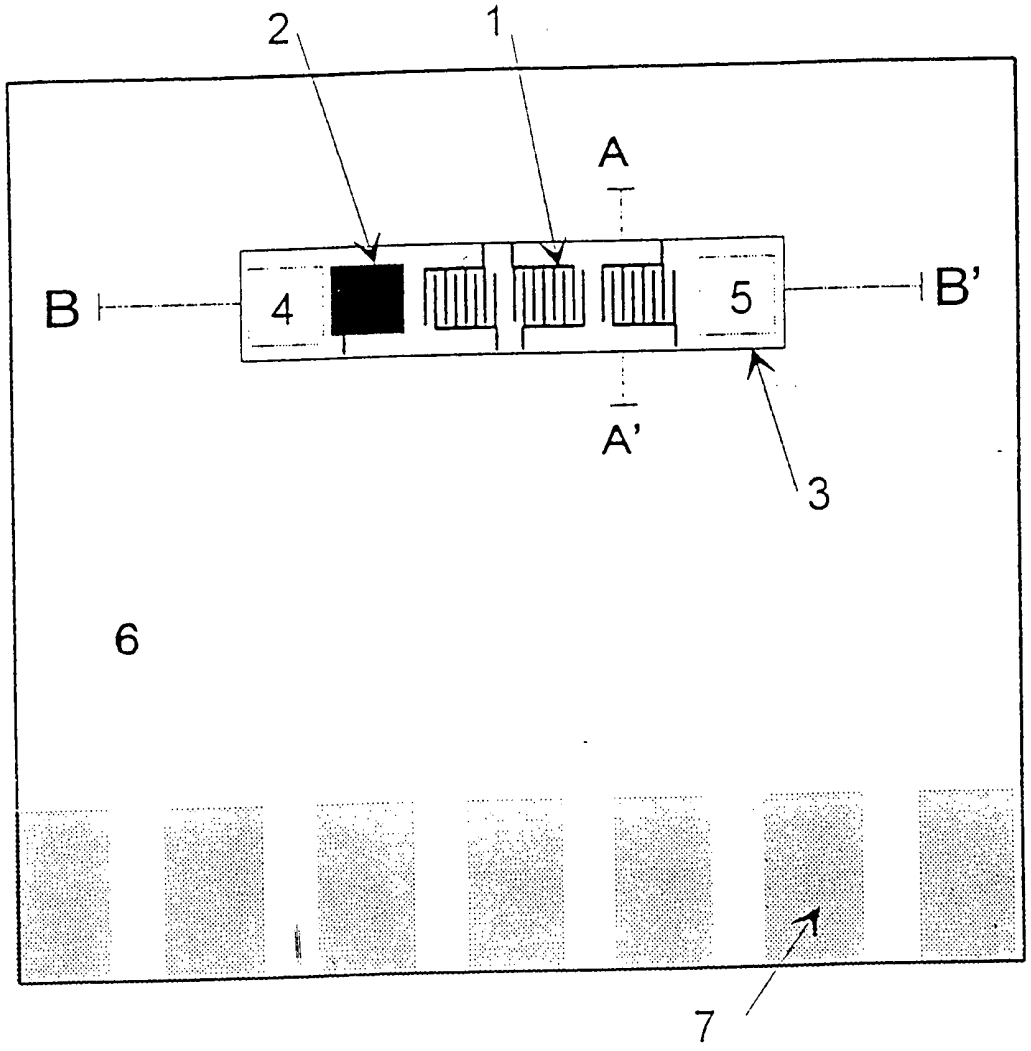


FIG.1

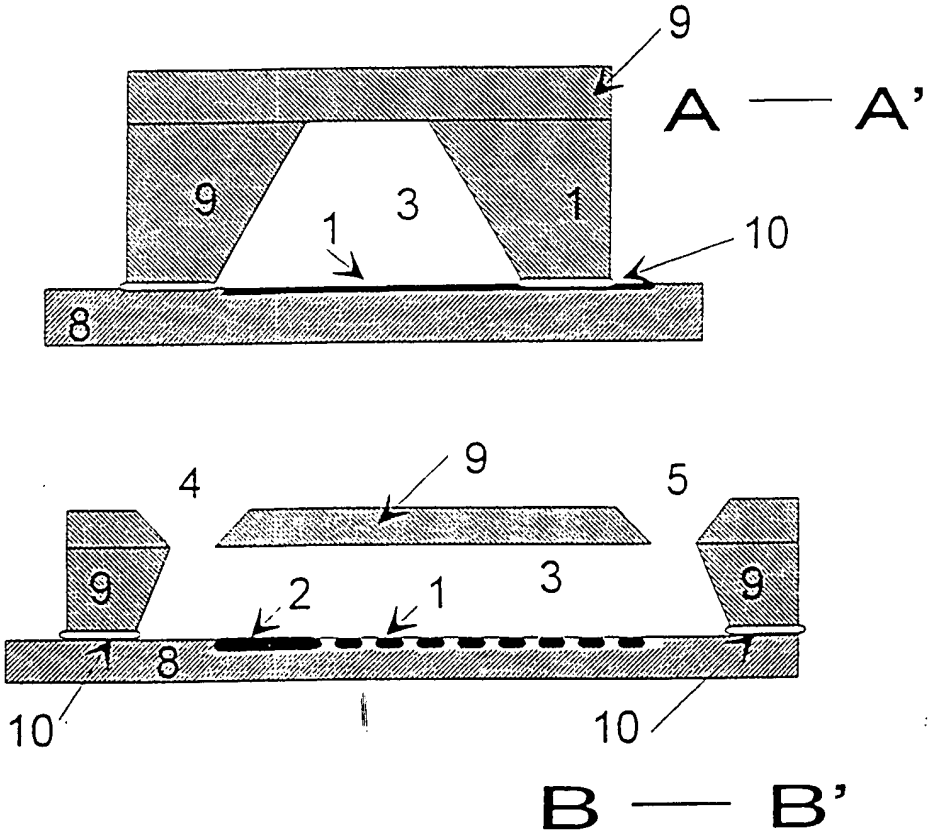


FIG.2

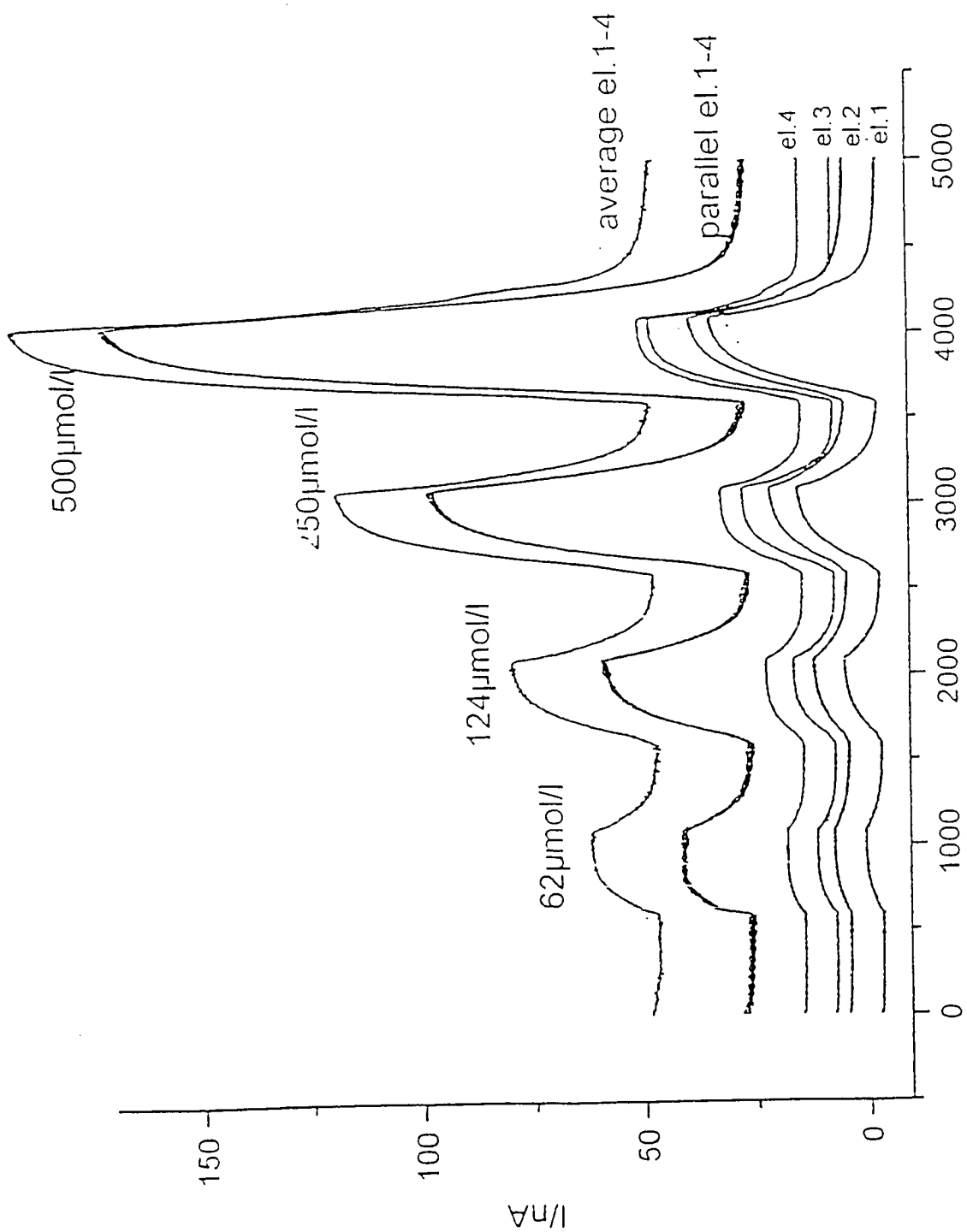

500µmol/l
250µmol/l
124µmol/l
62µmol/l
average el.1-4
parallel el.1-4
el.4
el.3
el.2
el.1
I/nA
150
100
50
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
t/0.1 * sec

FIG. 3

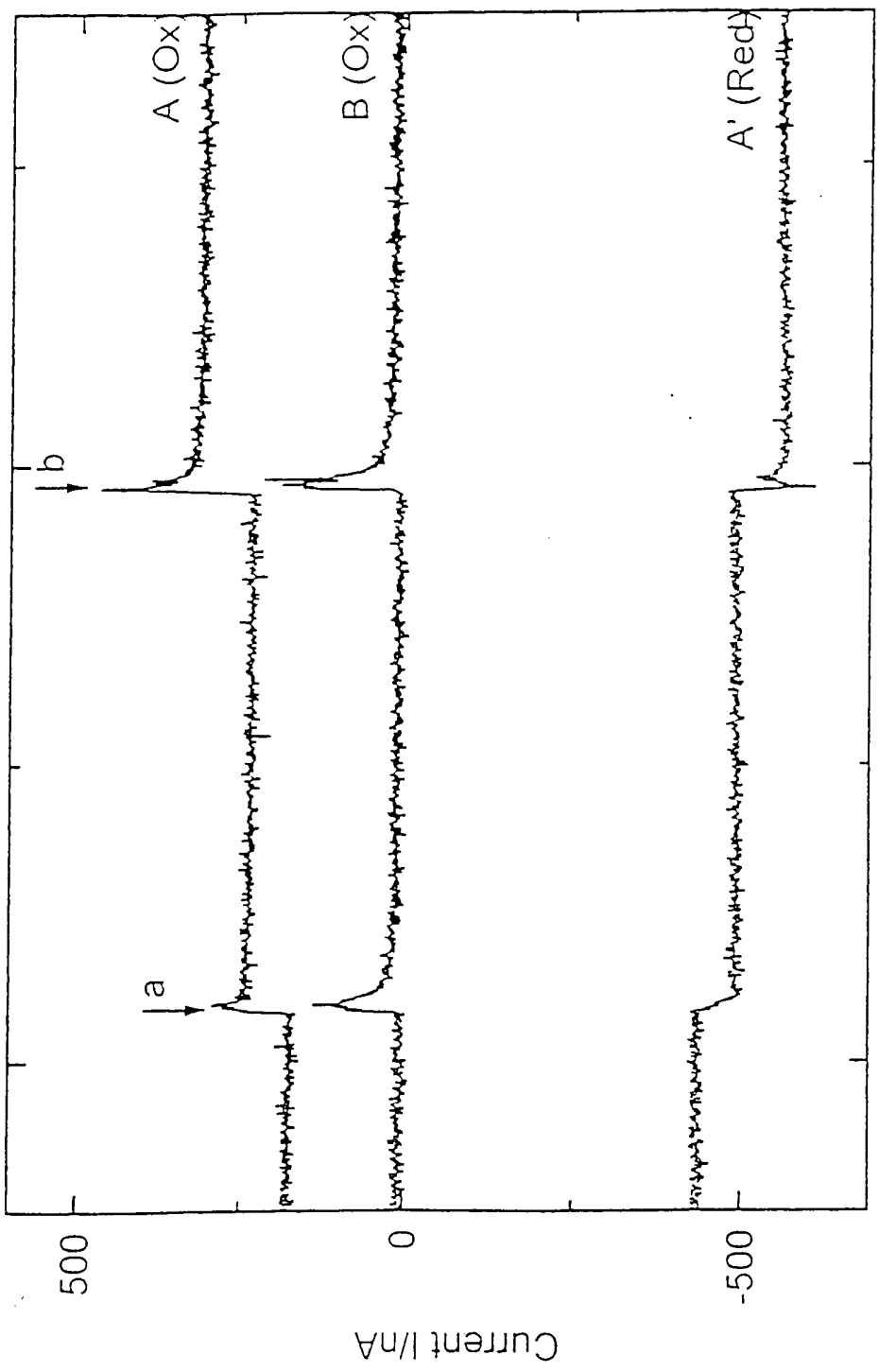


Fig.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/DE 94/00598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 G01N27/30 G01N27/28 G01N27/49

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO,A,90 15323 (SRI INTERNATIONAL) 13 December 1990 see the whole document ---	1,2,6-8 3-8,10
Y	WO,A,93 06237 (ALLAGE ASSOCIATES, INC.) 1 April 1993 see the whole document ---	4-8,10
Y	SENSORS AND ACTUATORS, vol.15, no.4, December 1988, LAUSANNE CH pages 337 - 345 SINCLAIR YEE, ET AL. 'MINIATURE LIQUID JUNCTION REFERENCE ELECTRODE WITH MICROMACHINED SILICON CAVITY' see the whole document --- -/--	3-8,10

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 September 1994	05. 10. 94

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bosma, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna al Application No
PCT/DE 94/00598

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol.62, 1990, COLUMBUS US pages 407 - 409 TOMOKAZU MATSUE, ET AL. 'MULTICHANNEL ELECTROCHEMICAL DETECTION SYSTEM FOR FLOW ANALYSIS' see the whole document ---	1-10
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol.64, 1992, COLUMBUS US pages 1118 - 1127 I. FRITSCH-FAULES, ET AL. 'USE OF MICROELECTRODE ARRAYS TO DETERMINE CONCENTRATION PROFILES OF REDOX CENTERS IN POLYMER FILMS' cited in the application see the whole document ---	1-3
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol.62, 1990, COLUMBUS US pages 447 - 452 OSAMU NIWA, ET AL. 'ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF REVERSIBLE REDOX SPECIES AT INTERDIGITATED ARRAY ELECTRODES WITH DIFFERENT GEOMETRIES: CONSIDERATION OF REDOX CYCLING AND COLLECTION EFFICIENCY' cited in the application see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Interm al Application No
PCT/DE 94/00598

Patent document cited in search report	Publicaüon date	Patent family member(s)	Publicaüon date
WO-A-9015323	13-12-90	NONE	
WO-A-9306237	01-04-93	US-A- 5312762	17-05-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr ales Aktenzeichen
PCT/DE 94/00598

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 G01N27/30 G01N27/28 G01N27/49

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 5 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,90 15323 (SRI INTERNATIONAL) 13. Dezember 1990	1,2,6-8
Y	siehe das ganze Dokument ---	3-8,10
Y	WO,A,93 06237 (ALLAGE ASSOCIATES, INC.) 1. April 1993 siehe das ganze Dokument ---	4-8,10
Y	SENSORS AND ACTUATORS, Bd.15, Nr.4, Dezember 1988, LAUSANNE CH Seiten 337 - 345 SINCLAIR YEE, ET AL. 'MINIATURE LIQUID JUNCTION REFERENCE ELECTRODE WITH MICROMACHINED SILICON CAVITY' siehe das ganze Dokument ---	3-8,10

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6. September 1994	05. 10. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bosma, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd.62, 1990, COLUMBUS US Seiten 407 - 409 TOMOKAZU MATSUE, ET AL. 'MULTICHANNEL ELECTROCHEMICAL DETECTION SYSTEM FOR FLOW ANALYSIS' siehe das ganze Dokument ---	1-10
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd.64, 1992, COLUMBUS US Seiten 1118 - 1127 I. FRITSCH-FAULES, ET AL. 'USE OF MICROELECTRODE ARRAYS TO DETERMINE CONCENTRATION PROFILES OF REDOX CENTERS IN POLYMER FILMS' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-3
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, Bd.62, 1990, COLUMBUS US Seiten 447 - 452 OSAMU NIWA, ET AL. 'ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF REVERSIBLE REDOX SPECIES AT INTERDIGITATED ARRAY ELECTRODES WITH DIFFERENT GEOMETRIES: CONSIDERATION OF REDOX CYCLING AND COLLECTION EFFICIENCY' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern ...les Aktenzeichen
PCT/DE 94/00598

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9015323	13-12-90	KEINE	
WO-A-9306237	01-04-93	US-A- 5312762	17-05-94